昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, August 2012, 55(8): 885 – 894 ISSN 0454-6296

家蚕和野桑蚕脂肪酸脱氢酶 *desat*4 全长 cDNA 和启动子的克隆及其原核表达

陈全梅，程道军，马振刚，胡晓明，查幸福，赵 萍*
（西南大学蚕学与系统生物学研究所，家蚕基因组生物学国家重点实验室，重庆 400716）

摘要：【目的】获得家蚕 *Bombyx mori* 和野桑蚕 *Bombyx mandarina* 脂肪酸脱氢酶基因 *desat*4 的 cDNA 及其启动子序列，并应用原核表达系统获得目的蛋白质，为进一步研究该基因的功能提供基础。【方法】利用 RACE 技术克隆家蚕和野桑蚕 *desat*4 基因全长 cDNA 序列，基于家蚕全基因组序列设计引物克隆它们的启动子，并采用原核表达技术对该基因进行异源表达。【结果】克隆得到家蚕与野桑蚕 *desat*4 基因全长 cDNA，长度分别为 1 717 bp 和 1 718 bp，ORF 长度为 1 059 bp，编码 352 个氨基酸残基，结构上有 3 个组氨酸保守区和 4 次跨膜结构域，说明该蛋白质是膜蛋白。同源性分析发现 Desat4 氨基酸序列与烟草天蛾 *Manduca sexta* MsexKPSE 脱氢酶拥有 88.9% 相似性。克隆获得的家蚕和野桑蚕 *desat*4 基因启动子序列长度分别为 1 808 bp 和 870 bp，该区域包含有热休克因子 HSF (heat shock factor) 结合位点、NIT2 结合位点和 CdxA (caudal type homeobox transcription factor A) 结合位点等等，并未发现有典型的 TATA-box，但在靠近 5′-UTR 区域发现了转录起始因子特征序列。时期表达谱分析显示 *desat*4 基因从刚产下卵到成虫(蛾)的 36 个不同发育时间点都有持续稳定的表达。应用原核表达系统成功地表达了 Desat4 蛋白质，并用温和变性剂十二烷基-β-D-麦芽吡喃糖苷(dodecyl-β-D-maltoside, DDM) 就能很好地促进该蛋白质的溶解。【结论】本研究成功地克隆了家蚕和野桑蚕 *desat*4 基因全长 cDNA 及其启动子序列并进行了序列比对分析，构建了 *desat*4 基因的原核表达载体并成功表达，为进一步研究该基因的功能提供参考。

关键词：家蚕；野桑蚕；脂肪酸脱氢酶；全长 cDNA；启动子；原核表达
中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2012)08-0885-10

Cloning of full-length cDNA and promoter sequences of fatty acid desaturase gene *desat*4 from silkworms, *Bombyx mori* and *B. mandarina*, and its prokaryotic expression

CHEN Quan-Mei, CHENG Dao-Jun, MA Zhen-Gang, HU Xiao-Ming, ZHA Xing-Fu, ZHAO Ping*
(State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Institute of Sericulture and Systems Biology, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract:【Aim】The main aim of this research was to clone and align the full-length cDNA and promoter sequences of *desat*4 gene from silkworms, *Bombyx mori* and *B. mandarina*, and construct prokaryotic expression vector to obtain a membrane protein Desat4 for further functional study. 【Methods】Full-length cDNA of the *desat*4 gene from silkworm was obtained through RACE technique, the encoded protein was expressed in *Escherichia coli* expression system, and its promoter sequences were cloned based on genome sequences of silkworm. 【Results】The full-length cDNA of the *desat*4 gene from *B. mori* and *B. mandarina* was 1 717 bp and 1 718 bp, respectively. Their open reading frame (ORF) is 1 059 bp in length and encodes 352 amino acid residues with four transmembrane helixes and three conserved histidine clusters, which are essential for desaturase catalytic activity. The deduced amino acid sequence shares 88.9% similarity to that of the fatty acid desaturase MsexKPSE (GenBank no. CAJ27975) of *Manduca sexta*. There is no typical TATA-box in promoter sequences, but there is a transcriptional initiator as well as other transcription factor binding sites, including HSF, NIT2, CdxA

基金项目：国家重大基础研究规划（“973”计划）项目(2012CB114600)；国家高技术研究发展计划（“863”计划）项目(2011AA00306)；国家自然科学基金重点项目(30972147)

作者简介：陈全梅，女，1986 年生，重庆人，博士研究生，研究方向为生物化学与分子生物学，Tel.: 023-68250748; E-mail: chenquan@swu.edu.cn
*通讯作者 Corresponding author, Tel.: 023-68251753; E-mail: zhaop@swu.edu.cn

收稿日期 Received: 2012-04-06; 接受日期 Accepted: 2012-08-02

and so on. The membrane protein Desat4 was expressed in *E. coli* expression system and solubilized with mild detergent DDM. 【Conclusion】The full-length cDNA and promoter sequences of *desat*4 gene from *B. mori* and *B. mandarina* were successfully cloned and comparatively analyzed. The membrane protein was expressed *in vitro* by pET system, thus providing a foundation for further functional study.

Key words: *Bombyx mori*; *Bombyx mandarina*; fatty acid desaturase; full-length cDNA; promoter; prokaryotic expression

家蚕 *Bombyx mori* 是由野桑蚕 *B. mandarina* 经过5 000 多年的人工选择和驯化而来，驯化过程使蚕的经济性状、生活习性及飞行交配能力等发生了改变。Xia 等(2009)对 40 个蚕基因组进行了重测序，鉴定了约 1 600 万个单核苷酸多态性位点(single nucleotide polymorphisms, SNPs)和许多的插入及结构变异，同时还发现了354 个可能受到人工选择的候选基因，其中一个候选基因脂肪酸脱氢酶基因 *desat*4(GenBank 登录号为 NM_001043506)与果蝇 *Drosophila* 脂酰脱氢酶基因 *desat*1 高度同源。果蝇 *desat*1 基因参与了果蝇性信息素合成途径关键的脱氢反应，而该基因的突变会影响果蝇的求偶行为(Marcillac *et al*., 2005)。

脂肪酸脱氢酶具有催化脱去脂酰链上特定位置的氢原子而形成不饱和脂酰链的活性，根据脱氢位置到羰基端的碳原子数 N 而命名为 ΔN-脱氢酶，该类酶需要与 NADH-细胞色素 b_5 还原酶(一种黄素蛋白)和细胞色素 b_5(一种血红素蛋白)形成复合酶的形式发挥催化活性(Holloway, 1971)。脂肪酸脱氢酶在结构上有 3 个保守组氨酸富含基序和 4 次跨膜结构域的特征(Los and Murata, 1998)。Wicker-Thomas 等(1997)从果蝇中克隆得到了一个同源于脊椎动物脂肪酸脱氢酶的基因 *desat*1，这也是昆虫中第一个被克隆的脂肪酸脱氢酶基因。随后从蛾类脂肪体或性信息腺中克隆获得较多的脂肪酸脱氢酶基因，并用脂肪酸脱氢酶缺陷的酵母表达系统进行催化活性分析：Matsumoto 研究小组从家蚕性信息腺克隆得到了4 个脂肪酸脱氢酶基因，其中 *desat*1 基因具有 Δ11 和 Δ10,12-脱氢活性，参与家蚕蚕蛾醇(bombykol)合成过程的两步连续脱氢反应(Yoshiga *et al*., 2000; Moto *et al*., 2004); Roelofs 研究小组报道了粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 2 个脱氢酶基因，Δ9-脂肪酸脱氢酶参与脂肪酸代谢(Liu *et al*., 1999)，Δ11-脂肪酸脱氢酶仅在性信息腺表达，参与性信息素的合成(Knipple *et al*., 1998); Rosenfield 等(2001)从美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea* 性信息腺和脂肪体中克隆得到了 4 个脂肪酸脱氢酶基因，分别命名为 *HzPGDs*1，*HzPGDs*2，*HzPGDs*3 和 *HzFBDs*，并用酵母表达系统分析了它们的表达产物的催化活性; Jeong 等(2003)报道了烟青虫 *Helicoverpa assulta* 7 个脂肪酸脱氢酶基因，对其中表达量最高的 3 个基因的表达产物进行了酶活性分析，HassNPVE 和 HassKPSE 都显示了 Δ9-脂肪酸脱氢酶活性，HassLPAQ 具有 Δ11-脂肪酸脱氢酶活性。目前克隆得到的大多数蛾类脂肪酸脱氢酶属于 Δ9-或 Δ11-脂肪酸脱氢酶，但是也有 Δ10-(Hao *et al*., 2002) 和 Δ14-(Roelofs *et al*., 2002)等不常见的脂肪酸脱氢酶被鉴定。

家蚕与野桑蚕 *desat*4 基因的基因序列包含有较多的 SNP 位点，但并未见家蚕与野桑蚕 *desat*4 基因的 cDNA 序列及其编码产物和启动子序列比较分析的相关报道。对 *desat*4 基因进行异源表达，有利于进一步研究该基因的功能。本研究拟利用 RACE 技术获得家蚕和野桑蚕 *desat*4 基因全长 cDNA 序列。基于家蚕全基因组序列，设计引物克隆家蚕和野桑蚕 *desat*4 基因的启动子序列，并对该段序列包含的调控元件进行预测及分析。构建 *desat*4 基因的原核表达载体，并在大肠杆菌 *Escherichia coli* C43(DE3)(Miroux and Walker, 1996)宿主菌里诱导表达，用 6 × His 抗体进行 Western blotting 检测，确认目的蛋白的表达，为下一步研究该基因的功能提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

试验用家蚕品种为大造，由西南大学家蚕基因库提供，试验用野桑蚕来自苏州，由本研究所林英副教授惠赠。Trizol、M-MLV 反转录酶、GeneRacer™ Kit 购自 Invitrogen 公司; *Taq* DNA 聚合酶、pMD19-T 载体、限制性内切酶 *Bam*H Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ购自 TaKaRa 公司; PMSF、6 × His 抗体和辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠 IgG(H + L)二抗购自碧云天生物技术研究所; RNA 抽提试剂盒和胶回收试剂盒购自上海华舜有限公司; PCR 纯化试剂盒和质粒

抽提试剂盒购自 Promega 公司；试验用各种变性剂为 Sigma 产品；其他化学药品均为分析纯。

1.2　*desat*4 全长 cDNA 克隆

以家蚕大造第 7 天的蛹和野桑蚕的蛹为材料，分别用液氮研磨至粉末，取 200 mg 左右粉末按照 RNA 抽提试剂盒操作说明书提取 RNA。根据 M-MLV 反转录酶操作说明将 RNA（1 μg）反转录成 cDNA，依据家蚕大造 *desat*4 基因序列用 Primer Premier 5.0 软件设计引物 P1（表 1）。PCR 扩增家蚕和野桑蚕 *desat*4 基因片段，PCR 体系如下：10 × ExTaq buffer 5 μL，25 mmol/L $MgCl_2$ 4.0 μL，10 mmol/L dNTPs 4.0 μL，10 μmol/L 上下游引物各 0.25 μL，2.5 U/μL *ExTaq* 0.5 μL，模板 cDNA 1 μL，加灭菌去离子水至 50 μL。PCR 扩增条件：94℃ 5 min；94℃ 40 s，60℃ 40 s，72℃ 2 min，35 个循环；72℃延伸 10 min，12℃保存。PCR 产物经过纯化后连接到 pMD19-T 载体上，热激转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，37℃、200 r/min 摇荡培养 1 h。取 100 μL 菌液涂布在含氨苄青霉素的 2 × YT 固体培养基上，37℃培养过夜。挑取单个菌落进行培养，菌液 PCR 筛选的阳性克隆送上海英骏生命技术有限公司进行测序验证。

表 1　本研究所用引物

Table 1　Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物用途 Use of primers	引物序列（5′－3′） Primer sequences	退火温度（℃） Annealing temperature
P1	表达谱	F：ATGGCGCCCAATGTAAAGGATGCAA	60
	Expression pattern	R：TCAATTGTCCTTAGGATTGATGCGG	
P2	5′ RACE	F：CGACTGGAGCACGAGGACACTGA	72
		R：CCGAGTTCCGCTGTCTTGTAGTC	
P3	5′ RACE 巢式	F：GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA	68
	5′ RACE nest	R：ACGTGCCCAATCTAAAGCAGAATCCT	
P4	3′ RACE	R：GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG	72
		F：TCCAGAACTGAAGAGAAAGGGCAAG	
P5	3′ RACE 巢式	F：TCTTCGTTGCGACTCTTTTCCGT	68
	5′ RACE nest	R：CGCTACGTAACGGCATGACAGTG	
P6	克隆全长 cDNA	F：GTTTTCTGCCGGACACGTGAGAGTTAATG	61
	Full cDNA cloning	R：AATTTTCTATAACGACAGACGAACGAGTAG	
P7	克隆启动子	F：TGAGCGCACCTACACGTTAGGGTGAAGC	58
	Promoter cloning	R：ATCGCGTCACTGTTCACCAAGCACACAC	
P8	亚克隆	F：CG*GGATCC*ATGGCGCCCAATGTAAAGGATGC	60
	Sub-cloning	R：CC*CTCGAG*ATTGTCCTTAGGATTGATGCGG	
*Bmactin*3	内参 Control	F：AACACCCCGTCCTGCTCACTG	60
		R：GGGCGAGACGTGTGATTTCCT	

参照 GeneRacer™操作说明书分别对家蚕和野桑蚕的 RNA 进行处理，用 SuperScript™ Ⅲ（Invitrogen 公司）试剂盒反转录获得 cDNA。依据上一步得到的家蚕与野桑蚕 *desat*4 序列设计扩增 5′-UTR 和 3′-UTR 序列的特异引物（P2，P4）和巢式引物（P3，P5）。第一轮 PCR 反应条件：94℃ 2 min；94℃ 30 s，72℃ 2 min，5 个循环；94℃ 30 s，70℃ 2 min，5 个循环；94℃ 30 s，68℃ 30 s，72℃ 2.5 min，25 个循环；72℃ 10 min；12℃保存，取 5 μL PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。第二轮巢式 PCR 反应条件：94℃ 2 min；94℃ 30 s，68℃ 30 s，72℃ 2 min，25 个循环；72℃ 10 min；12℃保存。1.5% 琼脂糖凝胶电泳 PCR 产物，回收具有明显条带的产物与 pMD19-T 载体连接，筛选的阳性克隆送上海英骏生命技术有限公司进行测序验证。

1.3　*desat*4 启动子克隆及顺式作用元件预测

参考家蚕全基因组序列（Xia *et al*., 2004），取 *desat*4 基因翻译起始子（ATG）上游 2 kb 长度序列设计克隆该基因启动子序列的引物 P7。分别以家蚕大造和野桑蚕基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增，

PCR 反应体系及反应条件同 1.2，产物经回收后克隆到 pMD19-T 载体上，筛选阳性克隆后进行测序验证。利用转录因子结合位点在线预测软件 TFSEARCH 1.3（http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html）预测启动子序列包含的顺式作用元件，最低得分设置为 95.0。

1.4 家蚕不同发育时期 *desat*4 基因表达谱分析

Trizol 法提取家蚕大造从刚产下的卵到成虫（蛾）36 个发育时期的总 RNA，根据 M-MLV 操作说明将 RNA（1 μg）反转录成 cDNA。设计 *desat*4 基因表达谱引物 P1 及内参基因 Bmactin3 引物进行 PCR 扩增，10 × Taq buffer 2.5 μL，25 mmol/L $MgCl_2$ 2.0 μL，10 mmol/L dNTPs 2.0 μL，10 μmol/L 上下游引物各 0.5 μL，2.5 U/μL rTaq 0.5 μL，模板 cDNA 1 μL，加灭菌去离子水至 25 μL。PCR 扩增条件：94℃ 4 min；94℃ 40 s，60℃ 40 s，72℃ 1.5 min，25 个循环；72℃ 延伸 10 min，12℃保存。结束后取 5 μL PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 *desat*4 基因原核表达及变性剂的筛选

1.5.1 原核表达载体构建及其在大肠杆菌中表达：分别在上游和下游引物 5′端引入 *Bam*H Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 酶切位点（P8）进行 PCR 扩增，PCR 回收试剂盒回收 PCR 产物。用 *Bam*H Ⅰ、*Xho* Ⅰ 双酶切 PCR 产物和 pET-28a（+）载体及由其改造的 α-pET-β 系列载体（载体由 Nelson 教授惠赠）（Leviatan *et al*., 2010），α、β 分别代表大肠杆菌亲水性蛋白质 YaiN（Herring and Blattner, 2004）、YbeL（Perna *et al*., 2001）），双酶切产物经纯化后连接转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，筛选阳性克隆后进行测序验证。选择测序正确的重组表达载体转化大肠杆菌 C43（DE3）感受态细胞，挑取单个菌落接种到 10 mL 含 20 μg/mL 卡那霉素的 TYE（1% 胰蛋白胨，0.5% 酵母提取物，0.5% NaCl）液体培养基中，37℃、200 r/min 摇荡培养 16 h。然后取 1 mL 菌液转移到 10 mL 生长培养基（1.2% 胰蛋白胨，2.4% 酵母提取物，0.4% 甘油，17 mmol/L KH_2PO_4，55 mmol/L K_2HPO_4，20 μg/mL Kam^+）培养到 OD_{600} = 0.6 ~ 0.8，在 18℃条件下用 1 mmol/L IPTG 诱导 16 h。诱导完后 4℃，8 000 r/min 离心 25 min 收集菌体，用 10 mL Sucrose buffer（0.3 mol/L 蔗糖，20 mmol/L MOPS，2 mmol/L PMSF，pH 7.0）重悬菌体。600 W 功率超声破碎菌体 20 min，4℃，6 000 r/min 离心 10 min，收集上清，用 15% SDS-PAGE 胶进行电泳检测（上样 10 μg 总蛋白质）。

1.5.2 Western blotting 检测：样品（上样 6 μg 总蛋白质）经 15% SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜上。用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 溶液 4℃封闭过夜，然后在 6 × His 一抗中 37℃孵育 2 h，用 TBST 洗膜 4 次，每次 5 min。辣根过氧化酶标记羊抗小鼠 IgG 的二抗中 37℃孵育 2 h，同样条件洗涤 PVDF 膜。用 ECL Advance（Amersham 公司）显色，柯达 X-OMAT BT 医用 X 射线胶片进行曝光 。

1.5.3 变性剂增溶作用检测：取 200 μL 在 1.5.1 中制备的上清溶液，加入 2% 各种变性剂：辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷（octyl-β-D-glucopyranoside, OGP）、N-壬酰基-N-甲基葡萄糖胺（N-nonanoyl-N-methyl-glucamine, MEGA-9）、fos-维生素（B-16 fos-choline-16）、3-[（3-胆固醇氨丙基）二甲基氨基]-2-羟基-1-丙磺酸（CHAPSO）、十二烷基-β-D-麦芽吡喃糖苷（dodecyl-β-D-maltoside, DDM）、胆酸钠盐（sodium chlorate hydrate）、聚乙二醇辛基苯基醚（Triton X-100），冰上孵育 10 min，4℃，150 000 g 离心 1 h（HITACHI，P80 转子）。收集上清，Bradford 法测定总蛋白质浓度后进行 Western blotting 检测（上样 6 μg 总蛋白质）。

2 结果

2.1 家蚕与野桑蚕 *desat*4 基因 cDNA 序列及其编码产物分析

根据 RACE 获得的 5′端和 3′端序列设计克隆 *desat*4 基因全长 cDNA 引物 P6，分别以家蚕大造和野桑蚕 cDNA 为模板进行 PCR 反应，筛选阳性克隆并测序验证。最终获得家蚕与野桑蚕 *desat*4 基因全长 cDNA 长度分别为 1 717 bp 和 1 718 bp（GenBank 登录号分别为 JQ729997 和 JQ729998），用 ClustalX 1.83（Thompson *et al*., 1997）软件进行序列比对（图 1）。结果显示家蚕与野桑蚕 *desat*4 基因全长 cDNA 序列只有位于 5′端的 4 个核苷酸差异，将全长 cDNA 序列与家蚕基因组数据（http://silkworm.genomics.org.cn/）进行比对发现由 5 个外显子组成，ORF 长度为 1 059 bp，编码 352 个氨基酸残基。用 ProtParam 在线预测软件（http://web.expasy.org/protparam/）预测 Desat4 蛋白质分子量与理论等电点分别为 40.88 kDa 和 9.15，TMHMM 2.0（http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/）预测跨膜结构显示 Desat4 蛋白质有 4 次跨膜结构域。Desat4 氨基酸序列在 NCBI 蛋白质数据库里进

行比对发现它与烟草天蛾 MsexKPSE 脱氢酶(GenBank 登录号为 CAJ27975)具有 88.9% 相似性。MsexKPSE 具有 Δ9-脱氢酶活性,且偏好于催化 16 个碳原子的脂肪酰链底物(Matouskova *et al*., 2007)。

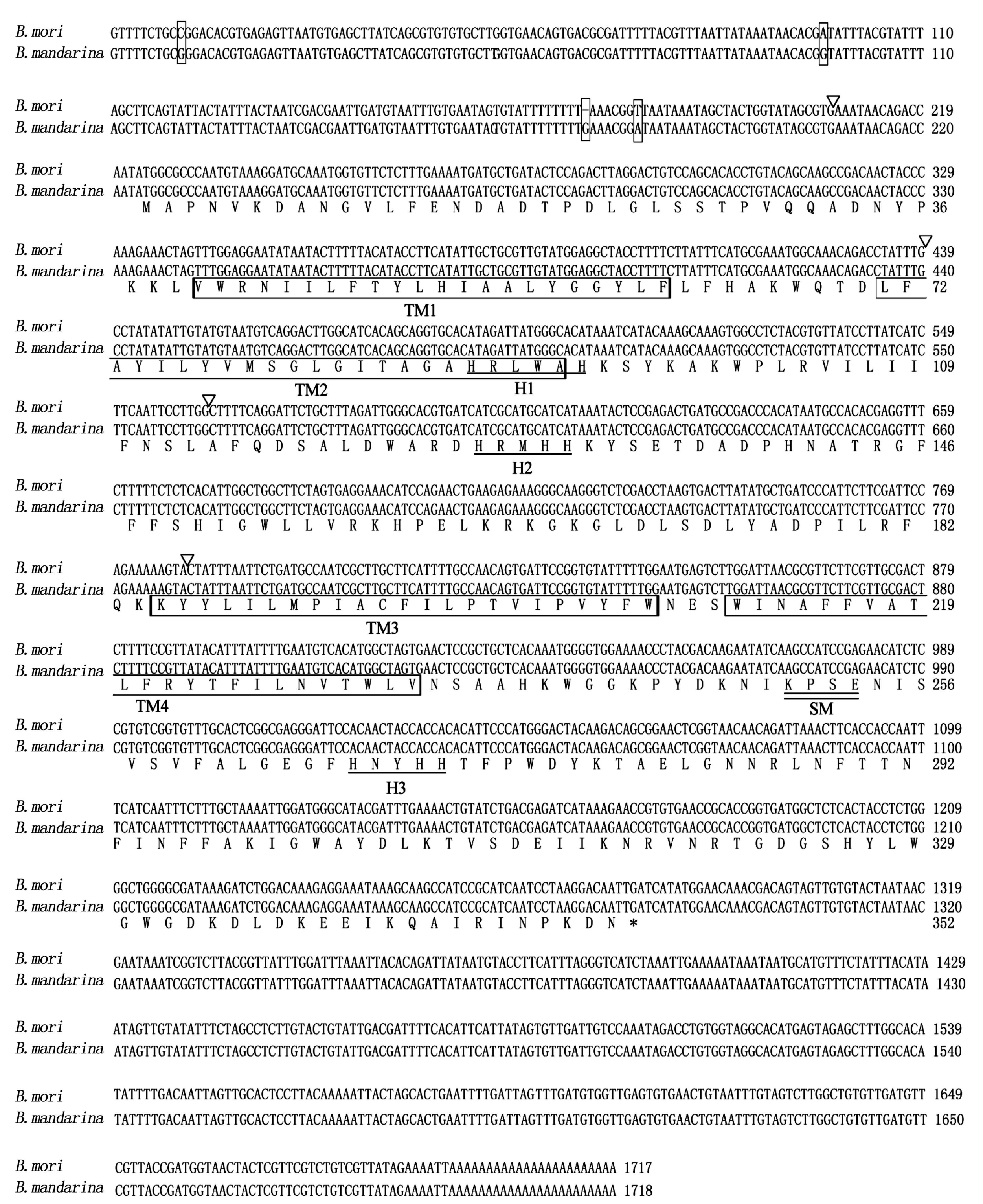


图 1　家蚕和野桑蚕 *desat*4 基因全长 cDNA 序列及推测的氨基酸序列比对

Fig. 1　Alignment of full-length cDNA and deduced amino acid sequences of *desat*4 from *Bombyx mori* and *B. mandarina*

单下划线部分表示富含组氨酸残基保守区;双下划线部分表示重要基序;长方框部分代表跨膜结构域;竖方框代表具有核苷酸差异;倒三角代表外显子与内含子交接处。Single underline shows conserved histidine clusters, double underline indicates signature motif, length frame means transmembrane domains, width frame displays the different nucleotides, and triangle marks the boundary of exon and intron.

2.2 家蚕与野桑蚕 *desat*4 基因的启动子克隆及顺式作用元件预测

克隆得到家蚕与野桑蚕 *desat*4 基因的启动子序列长度分别为 1 808 bp 和 870 bp，由于它们序列差异较大，所以用 Muscle3.6（Edgar，2004）软件进行序列比对(图 2)。在距离 5′UTR 36 bp 处有转录起始因子(initiator，Inr)特征序列 5′-CCAATTT-3′(Lo and Smale，1996)，故推测此处为 *desat*4 基因的转录起始位点。转录调控元件预测发现 *desat*4 基因的启动子序列包含有较多 HSF 结合位点，并且家蚕 *desat*4 基因启动子比野桑蚕 *desat*4 基因启动子多一段约 800 bp 的序列，该段序列包含有 6 个 HSP 转录调控元件结合位点是野桑蚕没有的。另外发现转录因子 V-Myb（avian myeloblastosis viral oncogene homolog)结合位点野桑蚕 A→家蚕 C 和 Skn-1 结合位点野桑蚕 CA→家蚕 TC，因而家蚕比野桑蚕多出这两个顺式作用元件。

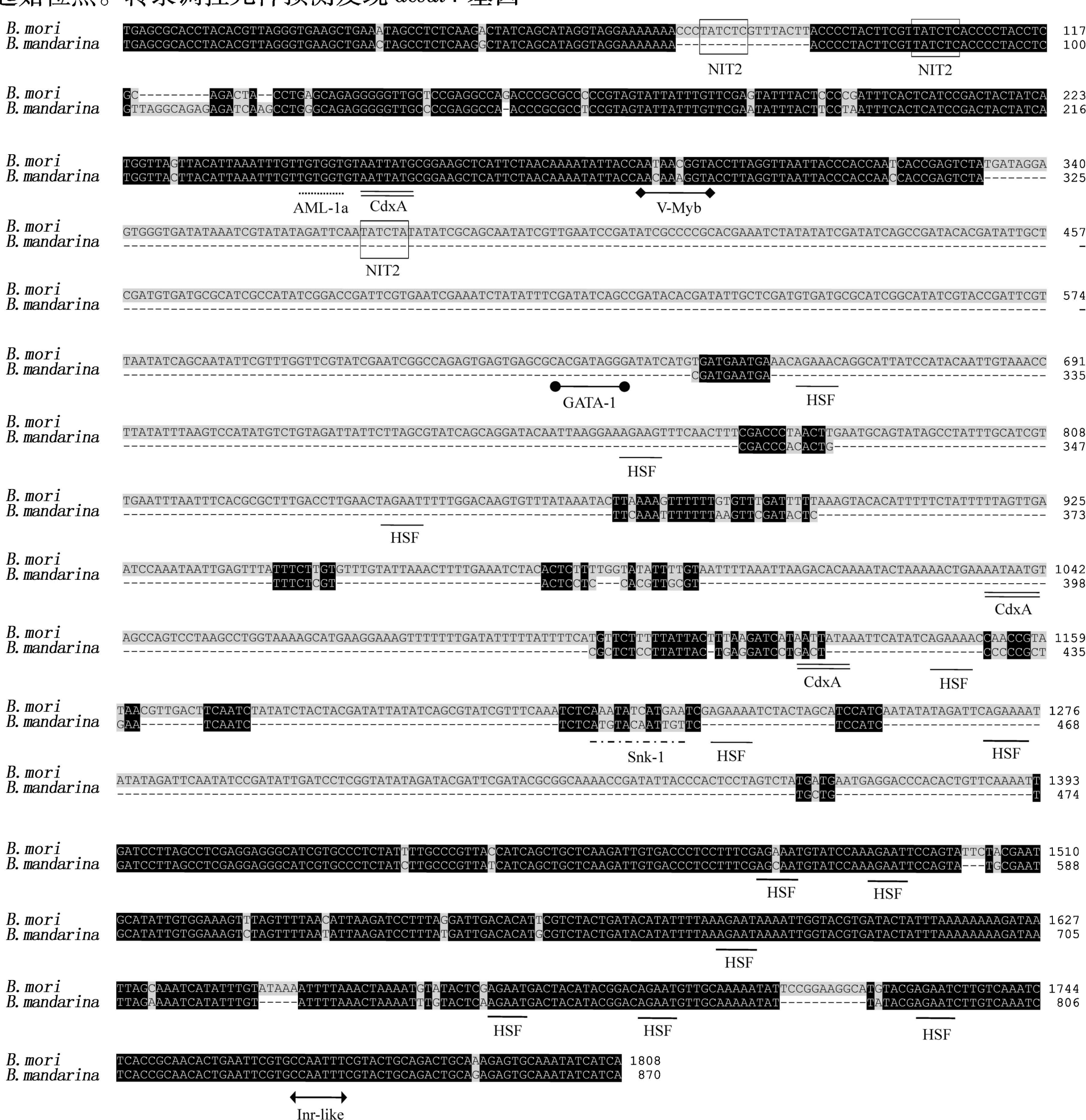


图 2 家蚕和野桑蚕 *desat*4 基因启动子序列比对及转录因子结合位点分析

Fig. 2 Alignment of the promoter sequence of *desat*4 gene from *Bombyx mori* and *B. mandarina* and the analysis of its transcription factor binding sites

长方框部分代表 NIT2 结合位点；黑点点代表 AML-1a 结合位点；双下划线部分代表 CdxA 结合位点；单下划线两端带菱形代表 V-Myb 结合位点；单下划线两端带圆圈代表 GATA-1 结合位点；短下划线相间黑点代表 Skn-1；单下划线两端带三角形代表转录起始相似位点；单下划线部分代表 HSF 结合位点；黑色阴影代表相同核苷酸。Length frame means NIT2, black drops shows AML-1a, double underline indicates CdxA, single underline with rhombus indicates V-Myb, single underline with circle indicates GATA-1, short single underline interphase indicates Skn-1, single underline with triangle indicates initiator, single underline shows HSF, and black shade indicates the same nucleotide.

2.3　家蚕不同发育时期 *desat*4 基因表达谱分析

应用 RT-PCR 方法调查家蚕 *desat*4 基因在从刚产下的卵到成虫(蛾)的 36 个发育时期的表达情况，结果显示该基因从刚产下的卵到成虫的 36 个发育时期持续表达，并且表达量并没有显著的变化(图3)。另外家蚕大造 *desat*4 基因在成虫(蛾)性信息腺(pheromone gland)、马氏管(Malpighian tubules)、精巢(testis)和卵巢(ovary)等多个组织都表达(Moto *et al*., 2004)。

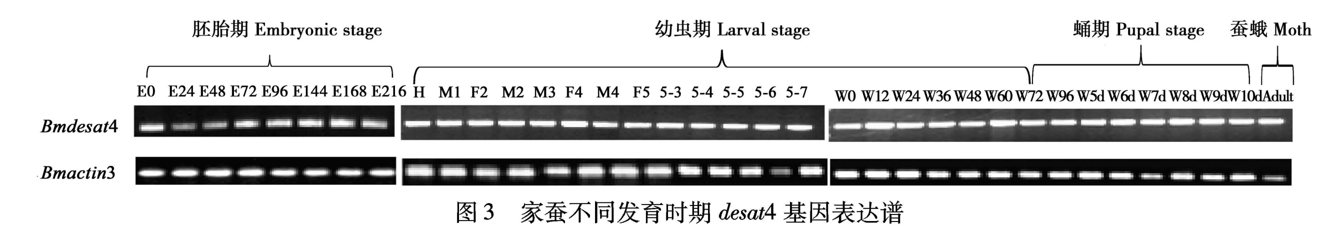


图3　家蚕不同发育时期 *desat*4 基因表达谱

Fig. 3　Expression profiles of *desat*4 gene from *Bombyx mori* at 36 time points by RT-PCR

E0 – E216：产卵后 0 – 216 h 0 – 216 h after oviposition；H：蚁蚕 Newly hatched larvae；M1：1 龄眠 Molting 1st instar larvae；F2：2 龄起 Newly exuviated 2nd instar larvae；M2：2 龄眠 Molting 2nd instar larvae；M3：3 龄眠 Molting 3rd instar larvae；F4：4 龄起 Newly exuviated 4th instar larvae；M4：4 龄眠 Molting 4th instar larvae；F5：5 龄起 Newly exuviated 5th instar larvae；5-3 – 5-7：5 龄第 3 天到 5 龄第 7 天 From day 3 5th instar larvae to day 7 5th instar larvae；W0 – W96：上蔟后 0 – 96 h 0 – 96 h after spinning；W5d – W10d：上蔟后第 5 天到第 10 天 From day 5 after spinning to day 10 after spinning；Adult：成虫 Moth.

2.4　*desat*4 基因原核表达及变性剂增溶作用检测

构建重组表达载体 pET-*desat*4，α-pET-*desat*4，β-pET-*desat*4，β-pET-*desat*4-β 和 α-pET-*desat*4-β，经过菌液 PCR 和 *Bam*H Ⅰ、*Xho* Ⅰ 双酶切验证筛选获得阳性克隆并进行测序验证，选取测序正确的重组表达载体进行表达。各重组载体表达的融合蛋白质由 Desat4(40.88 kDa)以及其 N 端和/或 C 端融合表达的可溶性蛋白质 α(10.84 kDa)或 β(14.19 kDa)和 His tag 组成。结果显示含重组表达载体 β-pET-*desat*4 和 β-pET-*desat*4-β 的单克隆细菌经 1 mmol/L IPTG 诱导后相对于对照(空载体 pET-28a 经过相同条件诱导表达)多出一条明显的蛋白质条带，分子量分别约为 55 kDa 和 69 kDa，与预期的蛋白质分子量大小一致，而 α-pET-*desat*4 和 α-pET-*desat*4-β 重组表达载体没有表达目的蛋白(图 4：A)。为了进一步确定 *desat*4 基因在大肠杆菌里成功表达，用 6 × His 一抗和辣根过氧化酶标记羊抗小鼠 IgG 二抗进行 Western blotting 检测。结果显示 β-pET-*desat*4 和 β-pET-*desat*4-β 重组子在预期分子量大小位置处有杂交信号，而对照没有任何杂交信号，pET-*desat*4 重组子也出现了杂交信号，但蛋白质的表达量不高，α-pET-*desat*4 和 α-pET-*desat*4-β 没有杂交信号(图 4：B)。说明 Desat4 蛋白质 N 端或在其两端都融合表达 β 蛋白质的表达载体能够在大肠杆菌里被诱导表达。

由于 Desat4 蛋白是一个具有 4 次跨膜结构域的膜蛋白，异源表达该蛋白质会与宿主菌膜结构结合，经超声破碎处理后会与细菌膜结构一起沉淀，因此，为了筛选增溶效果好的变性剂，我们选择成功表达的 β-Desat4 和 β-Desat4-β 融合蛋白质进行变性剂增溶作用的检测。结果显示融合蛋白质经所选的变性剂处理后均能在上清中检测到目的蛋白质，说明目的蛋白质是以可溶形式表达(图 5)。由于 Western blotting 检测时各样品上样总蛋白质量相同，根据检测到的蛋白质量与变性剂促溶效果成正相关进而选择促溶效果好的变性剂。结果显示 β-Desat4 融合蛋白质经 fos-choline-16 和 DDM 变性剂处理的增溶效果较其他变性剂好，结合 DDM 是温和的变性剂，有利于目的蛋白质后续的纯化及功能研究，所以选择 DDM 变性剂处理在 N 端融合表达 β 的重组蛋白质。

3　讨论与结论

脂肪酸脱氢酶普遍分布于动物、植物、细菌及真菌细胞中，根据其催化底物脂酰链结合载体的不同可分为脂酰-CoA、脂酰-lipid 和脂酰-ACP 脱氢酶三大类，脂酰-CoA 脱氢酶存在于动物、细菌及真菌细胞中，而其他两类存在于植物或蓝藻的各种膜结构上(Los and Murata, 1998)。大多数脂酰-CoA 脱氢酶是由 300 ~ 350 个氨基酸残基组成的疏水蛋白质，具有 4 次跨膜结构域。家蚕和野桑蚕脂肪酸脱氢酶 Desat4 由 352 个氨基酸残基组成，具有 4 次跨膜结构域，再结合家蚕和野桑蚕脂肪酸脱氢酶

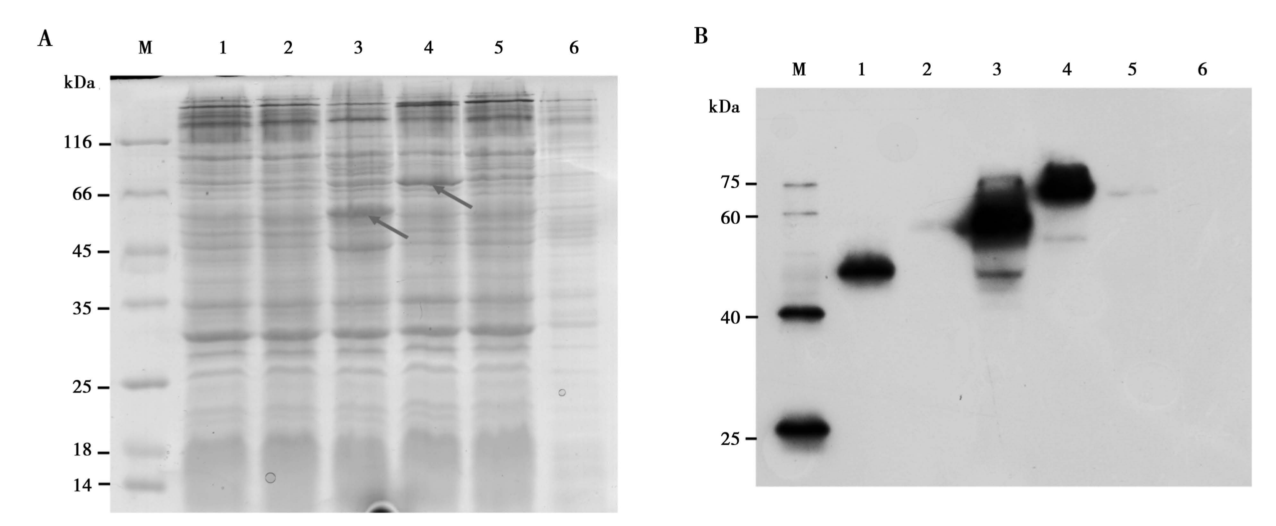


图 4 在大肠杆菌 C43(DE3)中表达家蚕 Desat4 蛋白质的 SDS-PAGE(A)分析和 Western blotting(B)检测

Fig. 4 SDS-PAGE analysis (A) and Western blotting detection (B) of the fusion proteins by adding α/β domain to the Desat4 of *Bombyx mori* expressed in *Escherichia coli* strain C43 (DE3)

M: 蛋白质分子量标准物 Protein molecular weight marker; 1: Desat4 重组蛋白 Desat4 membrane protein; 2: Desat4 N 端融合 α 的重组蛋白 A fusion protein by adding α domain to Desat4 protein at the N-terminus; 3: Desat4 N 端融合 β 的重组蛋白 A fusion protein by adding β domain to Desat4 protein at the N-terminus; 4: Desat4 N 端和 C 端都融合 β 的重组蛋白 A fusion protein by adding β domain to Desat4 protein at both termini; 5: Desat4 N 端融合 α, C 端融合 β 的重组蛋白 A fusion protein by adding α domain to Desat4 protein at the N-terminus and β domain at the C-terminus; 6: 空载体 pET-28a.

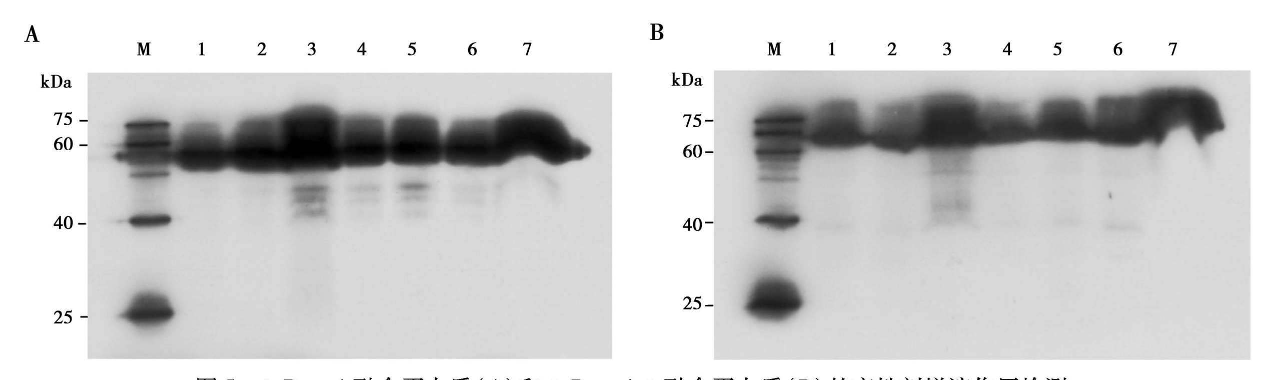


图 5 β-Desat4 融合蛋白质(A)和 β-Desat4-β 融合蛋白质(B)的变性剂增溶作用检测

Fig. 5 Western blotting analysis of detergent solubilization of the fused membrane proteins β-Desat4 (A) and β-Desat4-β (B)

M: 蛋白质分子量标准物 Protein molecular weight marker; 1: 辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷 Octyl-β-D-glucopyranoside (OGP); 2: N-壬酰基-N-甲基葡萄糖胺 N-nonanoyl-N-methylglucamine (MEGA-9); 3: Fos-维生素 B-16 Fos-choline-16; 4: 3-[(3-胆固醇氨丙基)二甲基氨基]-2-羟基-1-丙磺酸 CHAPSO; 5: 十二烷基-β-D-麦芽吡喃糖苷 Dodecyl-β-D-maltoside (DDM); 6: 胆酸钠盐 Sodium chlorate hydrate; 7: 聚乙二醇辛基苯基醚 Triton X-100.

Desat4 氨基酸序列的组氨酸保守区(H1:HxxxxH, H2:HxxHH 和 H3:ExxHxxHH)符合脂酰-CoA 脱氢酶的结构特征，因此推测 Desat4 属于脂酰-CoA 脱氢酶。

Knipple 等(2002)比较分析了蛾类和蝇类脂酰-CoA 脱氢酶结构特征，并提出了蛾类脂肪酸脱氢酶跨膜结构域、疏水结构域及亲水结构域空间安排的模型，而这些结构域相对于由 3 个保守组氨酸基序与铁原子结合形成的催化活性中心的位置决定了脱氢酶对底物的偏好性。脂肪酸脱氢酶的重要基序(signature motif)由位于第 3 个保守组氨酸基序(H3)上游的 4 个氨基酸残基组成，决定脱氢酶的催化活性，例如：包含有 KPSE 或 NPVE 重要基序的脱氢酶具有 Δ9-脱氢酶活性。进化分析显示家蚕脂肪酸脱氢酶 Desat4 与其他蛾类 Δ9-脂肪酸脱氢酶(C16 > C18)同源关系最近(Moto *et al*., 2004)，并且家蚕和野桑蚕 Desat4 氨基酸序列包含的重要基序为 KPSE。因此推测 Desat4 脱氢酶具有 Δ9-脱氢

酶活性，且偏好于催化 16 个碳原子的脂肪酰链底物。

应用 solexa 技术对 40 个蚕品种(29 个家蚕品种和 11 个野蚕品种)进行全基因组重测序，用 SoapSNP 软件分析发现 15 986 559 个 SNP，用 Sequenom 对这些 SNP 的准确性进行确认，正确率达到 96.7%，作者进一步分析发现有 354 个基因作为驯化的候选基因(Xia *et al*., 2009)。Desat4 基因就是其中之一，作者进一步用 PCR 的方法，以 40 个蚕品种的基因组作为模板，重新测了 *desat*4 基因的基因组序列，包括上游 3 kb 和下游 1 kb，一共大约 7 kb，结果发现该区域有 188 个 SNP，比 solexa 重测序得到的 SNP 多(未发表数据)。本研究比较分析家蚕和野桑蚕 *desat*4 基因 cDNA 序列差异，结果显示它们的蛋白质编码区域无差异，即编码的蛋白质序列无差异，仅在 5′UTR 区域发现 4 个核苷酸差异，说明该基因 SNP 位点主要分布在内含子区域和上游及下游区域。

在动物、植物和真菌细胞里，脂酰-CoA 类 Δ9-脱氢酶在脂肪酸代谢(Jeffcoat, 1979)和调节细胞膜的流动性以应对温度波动(Vigh *et al*., 1993; Tiku *et al*., 1996)等方面起着重要作用。在昆虫细胞里，脂肪酸脱氢酶功能研究主要集中在参与昆虫性信息素成分合成途径的脱氢反应(Labeur *et al*., 2002; Marcillac *et al*., 2005; Chertemps *et al*., 2006)，而对于高温、低温等环境因子的应答反应的相关研究较少。家蚕和野桑蚕脂肪酸脱氢酶基因 *desat*4 的启动子序列包含有较多的 HSF 转录因子结合位点，并且家蚕 *desat*4 基因的启动子比野桑蚕 *desat*4 启动子多一段包含有 6 个 HSP 的序列，推测家蚕被人类驯化后对温度的感受变得不那么敏感，在人类提供的良好生活环境里生活习惯后，已经不容易在户外温度变化较大的环境里生存。Desat4 氨基酸序列与果蝇 Desat1 及烟草天蛾 MsexKPSE 脱氢酶有较高相似性，说明它们具有相似的催化活性，但是并不能说明它们在昆虫体内执行相同的生物学功能。家蚕性信息素主要成分是蚕蛾醇，而合成该物质途径中的两步脱氢反应都由家蚕 Desat1 参与(Moto *et al*., 2004)，因此推测 Desat4 不参与蚕性信息素(蚕蛾醇)的合成途径。再结合 *desat*4 基因在家蚕整个生命周期都稳定的表达，推测该基因在家蚕体内参与其他生物学途径，起着重要的生物学功能。

可溶性蛋白质的异源表达已经有较多表达系统可用，例如，为了增加目的蛋白质的表达量和可溶性，经常将目的蛋白 N/C 端与其他可溶性蛋白标签(谷胱甘肽转移酶 GST、麦芽糖结合蛋白 MBP 和硫氧还蛋白 TRX 等)融合表达。目前，已经有很多可溶性蛋白以融合蛋白的形式得到成功表达，但是很少有膜蛋白被成功表达，主要原因是很难找到合适膜蛋白融合表达的标签蛋白。Nelson 研究团队以 pET28a 为骨架载体，构建了一系列在目的蛋白 N/C 端融合表达 α、β 结构域的表达载体，并成功表达了 13 个包含 6 ~ 12 个跨膜结构域的膜蛋白(Leviatan *et al*., 2010)。Desat4 蛋白是一个具有 4 次跨膜结构的膜蛋白，用一般的表达系统很难成功表达，本研究用 Nelson 教授惠赠的表达载体成功地表达了目的蛋白 Desat4，并用温和的变性剂 DDM 就能很好地达到增溶效果。应用原核表达系统成功表达 Desat4 蛋白，为后续的功能研究(例如晶体结构解析)提供基础。

致谢　感谢 Nelson Nathan 教授和 Leviatan Shani 博士(Tel Aviv University, Israel)提供 pET-28a 及由其改造系列原核表达载体；感谢匿名审稿专家提出的宝贵修改意见和建议。

参考文献(References)

Chertemps T, Duportets L, Labeur C, Ueyama M, Wicker-Thomas C, 2006. A female-specific desaturase gene responsible for diene hydrocarbon biosynthesis and courtship behaviour in *Drosophila melanogaster*. *Insect Molecular Biology*, 15(4): 465 – 473.

Edgar RC, 2004. Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5): 1792 – 1797.

Hao G, Liu W, O′Connor M, Roelofs W, 2002. Acyl-CoA *Z*9- and *Z*10-desaturase genes from a New Zealand leafroller moth species, *Planotortrix octo*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(9): 961 – 966.

Herring CD, Blattner FR, 2004. Global transcriptional effects of a suppressor tRNA and the inactivation of the regulator frmR. *Journal of Bacteriology*, 186(20): 6714 – 6720.

Holloway PW, 1971. A requirement for three protein components in microsomal stearyl coenzyme A desaturation. *Biochemistry*, 10(9): 1556 – 1560.

Jeffcoat R, 1979. The biosynthesis of unsaturated fatty acids and its control in mammalian liver. *Essays in Biochemistry*, 15: 1 – 36.

Jeong SE, Rosenfield CL, Marsella-Herrick P, You KM, Knipple DC, 2003. Multiple acyl-CoA desaturase-encoding transcripts in pheromone glands of *Helicoverpa assulta*, the oriental tobacco budworm. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(6): 609 – 622.

Knipple DC, Rosenfield CL, Miller SJ, Liu W, Tang J, Ma PW,

Roelofs WL, 1998. Cloning and functional expression of a cDNA encoding a pheromone gland-specific acyl-CoA Delta11-desaturase of the cabbage looper moth, *Trichoplusia ni*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(26): 15287-15292.

Knipple DC, Rosenfield CL, Nielsen R, You KM, Jeong SE, 2002. Evolution of the integral membrane desaturase gene family in moths and flies. *Genetics*, 162(4): 1737-1752.

Labeur C, Dallerac R, Wicker-Thomas C, 2002. Involvement of desat1 gene in the control of *Drosophila melanogaster* pheromone biosynthesis. *Genetica*, 114(3): 269-274.

Leviatan S, Sawada K, Moriyama Y, Nelson N, 2010. Combinatorial method for overexpression of membrane proteins in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(31): 23548-23556.

Liu W, Ma PW, Marsella-Herrick P, Rosenfield CL, Knipple DC, Roelofs W, 1999. Cloning and functional expression of a cDNA encoding a metabolic acyl-CoA delta 9-desaturase of the cabbage looper moth, *Trichoplusia ni*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29(5): 435- 443.

Lo K, Smale ST, 1996. Generality of a functional initiator consensus sequence. *Gene*, 182(12): 13-22.

Los DA, Murata N, 1998. Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1394(1): 3-15.

Marcillac F, Grosjean Y, Ferveur JF, 2005. A single mutation alters production and discrimination of *Drosophila* sex pheromones. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1560): 303-309.

Matouskova P, Pichova I, Svatos A, 2007. Functional characterization of a desaturase from the tobacco hornworm moth (*Manduca sexta*) with bifunctional *Z*11- and 10,12-desaturase activity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(6): 601-610.

Miroux B, Walker JE, 1996. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal of Molecular Biology*, 260(3): 289-298.

Moto K, Suzuki MG, Hull JJ, Kurata R, Takahashi S, Yamamoto M, Okano K, Imai K, Ando T, Matsumoto S, 2004. Involvement of a bifunctional fatty-acyl desaturase in the biosynthesis of the silkmoth, *Bombyx mori*, sex pheromone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(23): 8631-8636.

Perna NT, Plunkett G, Burland V, Mau B, Glasner JD, Rose DJ, Mayhew GF, Evans PS, Gregor J, Kirkpatrick HA, Posfai G, Hackett J, Klink S, Boutin A, Shao Y, Miller L, Grotbeck EJ, Davis NW, Lim A, Dimalanta ET, Potamousis KD, Apodaca J, Anantharaman TS, Lin J, Yen G, Schwartz DC, Welch RA, Blattner FR, 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Nature*, 409(6819): 529-533.

Roelofs WL, Liu W, Hao G, Jiao H, Rooney AP, Linn CE, 2002. Evolution of moth sex pheromones via ancestral genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(21): 13621-13626.

Rosenfield CL, You KM, Marsella-Herrick P, Roelofs WL, Knipple DC, 2001. Structural and functional conservation and divergence among acyl-CoA desaturases of two noctuid species, the corn earworm, *Helicoverpa zea*, and the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31(10): 949-964.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24): 4876-4882.

Tiku PE, Gracey AY, Macartney AI, Beynon RJ, Cossins AR, 1996. Cold-induced expression of delta 9-desaturase in carp by transcriptional and posttranslational mechanisms. *Science*, 271(5250): 815-818.

Vigh L, Los DA, Horvath I, Murata N, 1993. The primary signal in the biological perception of temperature: Pd-catalyzed hydrogenation of membrane lipids stimulated the expression of the desA gene in synechocystis PCC6803. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(19): 9090-9094.

Wicker-Thomas C, Henriet C, Dallerac R, 1997. Partial characterization of a fatty acid desaturase gene in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27(11): 963-972.

Xia QY, Guo Y, Zhang Z *et al*., 2009. Complete resequencing of 40 genomes reveals domestication events and genes in silkworm (*Bombyx*). *Science*, 326 (5951): 433-436.

Xia QY, Zhou Z, Lu C *et al*., 2004. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science*, 306(5703): 1937-1940.

Yoshiga T, Okano K, Mita K, Shimada T, Matsumoto S, 2000. cDNA cloning of acyl-CoA desaturase homologs in the silkworm, *Bombyx mori*. *Gene*, 246(1-2): 339-345.

(责任编辑: 赵利辉)